

열처리 양파로부터 항산화물질의 분리동정

— 연구노트 —

황인국¹ · 김현영² · 이상훈² · 황초룡² · 오승희² · 우관식³ · 김대중⁴ · 이준수² · 정현상^{2*}

¹국립농업과학원 농식품자원부, ²충북대학교 식품공학과
³국립식량과학원 기능성작물부, ⁴충북대학교 수의학과

Isolation and Identification of an Antioxidant Substance from Heated Onion (*Allium cepa* L.)

In Guk Hwang¹, Hyun Young Kim², Sang Hoon Lee², Cho Rong Hwang², Seung Hee Oh²,
Koan Sik Woo³, Dae Joong Kim⁴, Junsoo Lee², and Heon Sang Jeong^{2*}

¹Dept. of Agro-food Resources, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Gyeonggi 441-857, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

³Dept. of Functional Crop, National Institute of Crop Science,
Rural Development Administration, Gyeongnam 627-803, Korea

⁴Laboratory of Cancer Prevention, College of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract

The objectives of this study were to identify antioxidant substance in heated onion. The isolation of active compound was performed in three steps: silica gel column chromatography, preparative TLC, and preparative HPLC. The structure of the purified compound was determined using spectroscopic methods, i.e., ultraviolet, mass spectrometry, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and DEPT. The antioxidant activities of isolated compound were evaluated and compared with α -tocopherol, ascorbic acid, and butylated hydroxytoluene (BHT) using DPPH and ABTS assay. The isolated compound was identified as 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP). The DPPH radical-scavenging activity (IC₅₀) of the DDMP was in the following order: ascorbic acid (45.3 μ g/mL) > α -tocopherol (69.2 μ g/mL) > DDMP (241.6 μ g/mL) > BHT (268.0 μ g/mL). In addition, DDMP showed strong ABTS radical-scavenging activity of 569.0 mg AA eq/g.

Key words: onion (*Allium cepa* L.), antioxidant activity, heat treatment, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP)

서 론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과 파속 식물로 내한성 식물체로 다양한 기후조건에서 생육할 수 있어 거의 전 세계에서 재배되며 마늘과 함께 우리나라의 대표적인 향신료로 사용되어 왔으며(1,2), 양파에는 지방, 탄수화물, 단백질 같은 일반성분 이외에 diallyl disulfide, allyl propyl disulfide와 같은 황 함유화합물과 quercetin, rutin, kaempferol 등의 flavonoid류 화합물이 다량 함유되어 있어 항산화, 항암, 항고혈압, 항동맥경화 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(3-6).

최근 한국인의 식생활습관의 서구화로 인해 각종 암과 다양한 성인병이 증가되면서 건강에 대한 관심이 높아지고 기능성식품에 대한 요구는 증대되고 있다. 인체 대사과정 중 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 인

간의 질병과 노화의 주요한 요인으로 이를 효과적으로 제거할 수 있는 항산화제의 개발에 관심이 높으며, 또한 안전성 문제로 butylated hydroxyanisole(BHA)나 butylated hydroxytoluene(BHT)와 같은 합성항산화제의 사용이 규제되면서 식품을 포함한 천연식물로부터 천연 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다(7,8).

Roasting, blanching, boiling 및 autoclaving과 같은 열처리방법은 일반적으로 식품의 저장수명을 연장하고 품질을 향상시키기 위해 사용되어 왔지만, 최근 표고버섯(9), 마늘(10), 한국산 배(11), 감초(12), 무(13), 멜론, 사과, 참외 및 수박(14) 등을 열처리 시 페놀성 화합물 및 항산화활성이 증가한다고 보고하는 등 식품의 기능성강화를 위하여 열처리 공정을 적용하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

전보에서 열처리에 따른 양파의 항산화활성 변화(15) 및

*Corresponding author. E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2570, Fax: 82-43-271-4412

용매분획물의 항산화활성(16)을 평가한 결과 ethyl acetate 층에서 높은 항산화활성을 나타내었다. 이에 본 연구에서는 열처리 양파 중에 함유된 항산화물질을 구명하기 위하여 ethyl acetate 분획물로부터 항산화활성 물질을 분리·동정하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 양파(*Allium cepa* L.)는 2007년 무안에서 생산된 것으로 몽탄농협에서 구입하여 사용하였다. 구입한 양파는 100 g씩 절단하여 polyethylene 필름에 포장한 후 -20°C 냉동고에 저장하면서 사용하였다. 시료의 열처리는 10 kg/cm² 이상의 압력에서도 견딜 수 있도록 고안·제작된 (Jisco, Seoul, Korea) 열처리장치를 사용하여 양파 2 kg을 130°C, 2 hr 열처리하여 분쇄한 후 착즙하였다. 착즙액은 Whatman No. 2 여과지로 여과한 후 *n*-hexane, chloroform 및 ethyl acetate 순으로 용매분획 한 다음 ethyl acetate 층만을 회전진공농축기(N-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 40°C에서 용매를 완전히 제거한 후 분리·정제용 시료로 사용하였다.

항산화물질의 분리 및 정제

열처리된 양파 착즙액의 ethyl acetate 분획 층으로부터 항산화물질을 분리하기 위하여 silica gel column chromatography를 실시하였다. Silica gel(Kiesel gel 60, 70~230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)이 충전된 column에 ethyl acetate 분획물 2 g을 로딩 하여 1차 silica gel column (500×35 mm, i.d.) chromatography를 실시하였다. 용출용매는 dichloromethane(DCM)과 metanol(MeOH)을 용매로 MeOH 농도를 점차적으로 증가시키면서(20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0:1, v/v) 각 농도별로 250 mL씩 용출하여 50 mL 단위로 24개의 소획분을 얻었다. 이중 DPPH 라디칼 소거능이 우수한 분획을 합하여 감압농축 후 2차 silica gel column(300×10 mm, i.d.) chromatography를 실시하였다. 용출용매의 조성은 1차 silica gel column chromatography와 같은 용매조성으로 각 농도별로 200 mL씩 용출하여 30 mL 단위로 30개의 소분획을 얻었으며, DPPH 라디칼 소거능이 우수한 분획을 합하여 감압농축 후 MeOH에 재용해하여 preparative TLC plate(Kiesel gel 60 F₂₅₄)에 spotting 한 후 DCM과 MeOH (20:1, v/v) 조성으로 전개하여 UV 흡수양상 및 발색 시 나타나는 spot의 R_f치를 확인하였다. 활성을 나타내는 부분의 silica gel를 긁어모아 MeOH로 흡착성분을 용출시킨 후 감압농축 하여 preparative HPLC(Younglin, Anyang, Korea)로 활성물질을 최종 정제하였다. 이때 칼럼은 RP-C₁₈ column (Discovery® C₁₈ column; 250×10 mm, i.d., 5 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA), 이동상은 isocratic 방식으로 water: acetonitrile: acetic acid(97:3:0.1, v/v/v), 유속은 3.5 mL/min, 검출기는 UV-detector(298 nm), 주입량은 200 µL로

하여 항산화물질을 분리하였다. 분리된 물질이 단일 성분인지를 확인하기 위하여 analytical HPLC(Thermo Separation Products, Waltham, MA, USA)로 분석하였다. 칼럼은 RP-18 column(Purospher® C₁₈ column; 250×4.6 mm, i.d., 5 µm, Merck), 이동상은 5% acetonitrile, 유속은 0.8 mL/min, 검출기는 UV-detector(298 nm), 주입량은 20 µL로 하였다.

항산화물질의 동정

활성물질의 구조 동정을 위하여 분리한 물질을 CD₃OD에 용해하여 ¹H nuclear magnetic resonance(NMR, 500 MHz), ¹³C NMR(125 MHz), Distortionless Enhancement by Polarization transfer(DEPT) spectra는 Avance 500 spectrometer(Bruker Analytic GmbH, Karlsruhe, Germany) 분석에 의해 얻었고, 분자량은 gas chromatography/mass spectrometer detector(GC/MSD, Agilent 6890 gas chromatograph/5973N; Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 확인하였다.

분리된 물질의 항산화활성 측정

분리된 물질의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 라디칼 소거능은 Hwang 등(17)이 제시한 방법으로 측정하였다. 즉, 시료 200 µL에 에탄올에 용해된 0.2 mM DPPH용액 800 µL를 첨가하여 30초간 진탕 후 암소에서 30분간 반응시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교구로 천연항산화제인 vitamin E 및 C(ascorbic acid, AA)와 합성항산화제인 BHT를 이용하였으며, DPPH 라디칼을 50% 감소시키는 농도를 IC₅₀ (Inhibition concentration)으로 나타내었다. 총 항산화력은 ABTS·⁺ decolorization assay 방법(17)에 의하여 측정하였다. 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich) 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 12시간 이상 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성시킨 후 이용액을 735 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 1 mL에 시료 50 µL를 가하여 흡광도의 변화를 30분 후에 측정하였으며, 총 항산화력은 mg AA eq/g으로 계산하여 표시하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS Ver 12.0 package program을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

항산화물질의 분리·정제 및 구조 동정

전보(15,16)에서 우수한 항산화활성을 보인 130°C, 2 hr 열처리 양파 착즙액의 ethyl acetate 층을 1차 silica gel column chromatography를 실시하여 총 24개 소획분을 얻었다. 각각의 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과

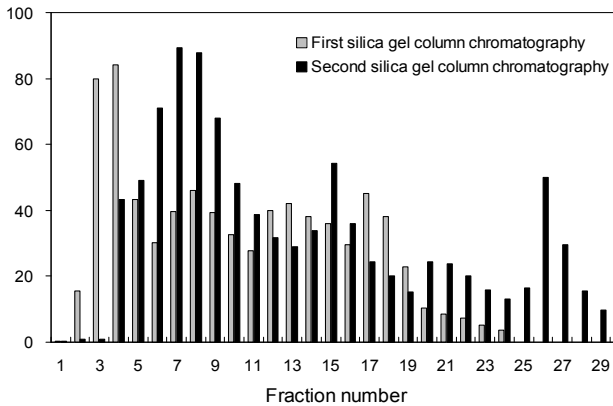


Fig. 1. Electron donation ability (EDA %) by DPPH assay of the first and second silica gel column chromatography fractions.



Fig. 2. Thin layer chromatography patterns on active fraction (B6~B8).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 3번과 4번 분획에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 3과 4번 두 분획을 합하여 농축한 후 (1.02 g) 2차 silica gel column chromatography를 실시하여 총 30개의 소획분을 얻었고, 각각의 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과 Fig. 1과 같이 6~8번 분획에서 높은 항산화활성을 나타내었다. 이 분획을 농축하여 preparative TLC로 전개시킨 후 활성 spot 및 R_f 값 0.35(B6~B8)를 확인하였다(Fig. 2). R_f 값 0.35 위치 부분의 silica gel을 분취하여 MeOH로 흡착된 성분을 용출시킨 후 농축하여 preparative HPLC를 이용하여 최종 활성물질 36 mg을 얻었고, 분리된 물질은 analytical HPLC로 분석하여 단일물질임을 확인하였다(Fig. 3).

활성물질은 UV scan 결과 298 nm에서 최대 흡수파장을 보였으며, GC/MSD(Fig. 4) 결과(m/z 144, 115, 101, 72, 55,

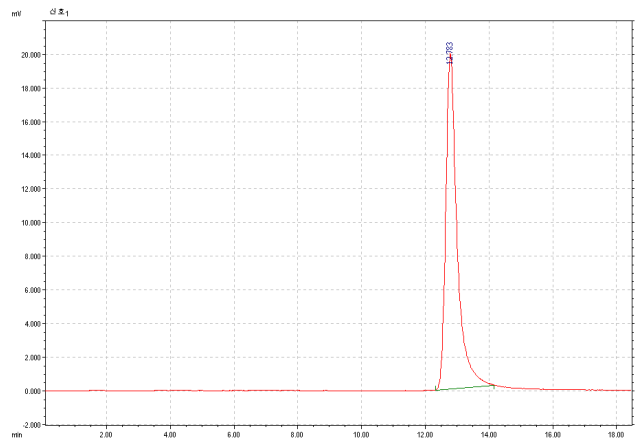


Fig. 3. Analytical HPLC chromatogram for the isolated compound.

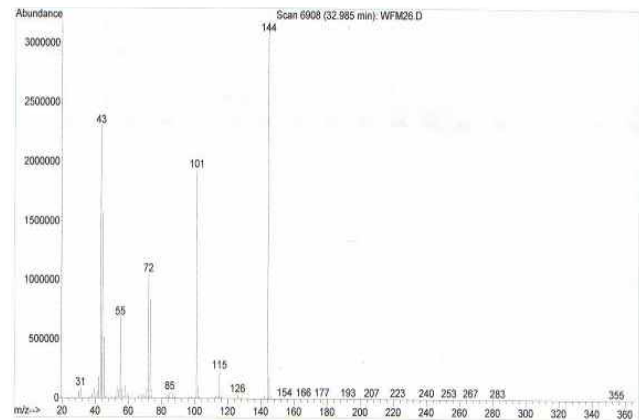


Fig. 4. GC/MSD spectrum for the isolated compound.

43) 분자량은 약 144 정도 되는 화합물로 확인되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(Fig. 5(A)) 결과 δ (ppm) 2.038(3H, δ_c 15.653), 4.087(2H, δ_c 72.764), 4.189(1H, δ_c 69.139)가 관찰되었고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(Fig. 5(B)) 결과 δ (ppm) 15(CH_3), 69(CH), 72(CH_2), 132(quaternary carbon), 161(carbonyl carbon, $\text{C}=\text{O}$), 189(ketone carbon, CO)가 관찰되었다. 따라서 열처리 양과로부터 분리한 물질은 최종 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one(DDMP)로 확인되었다(18-20)(Fig. 6).

분리된 물질의 항산화활성

분리된 DDMP의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 1과 같다. DPPH 라디칼 소거능의 측정 결과 DDMP의 IC_{50} 값은 241.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며 천연 항산화제인 vitamin E 및 ascorbic acid의 IC_{50} 값은 각각 69.2 및 45.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고 합성 항산화제인 BHT의 IC_{50} 값은 268.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. DDMP의 IC_{50} 값은 vitamin E와 ascorbic acid에 비해 3~4배가량 낮은 항산화활성은 보였지만, 합성 항산화제인 BHT와는 유사한 항산화활성을 나타내었다. ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정결과 DDMP의

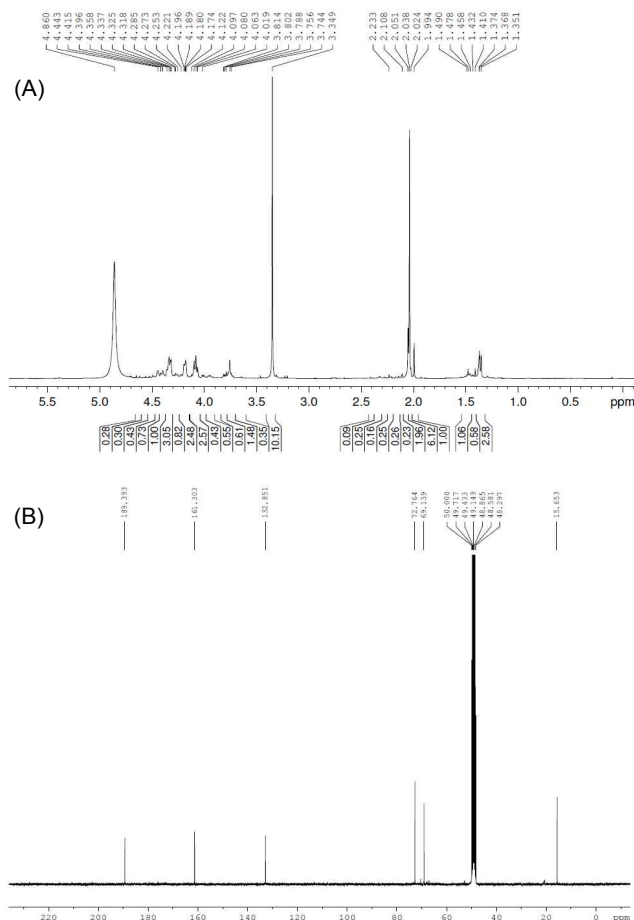


Fig. 5. ¹H-NMR (A) and ¹³C-NMR (B) spectrum for the isolated compound.

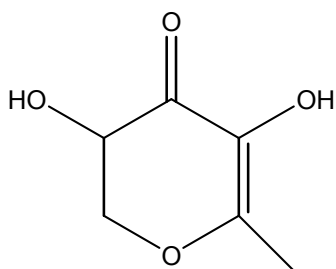


Fig. 6. Chemical structure of DDMP (2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one).

AEAC(ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)값은 569.0 mg AA eq/g으로 높은 항산화력을 보였다. 양파에는 황화합물과 fisetin, quercetin, dihydroquercetin, robinetin, myricetin 등의 flavonoid 화합물이 함유되어 있고 대표적인 활성물질은 quercetin으로 보고되어 있다(3,18). Moon 등 (19)은 DPPH 라디칼을 이용한 quercetin의 IC₅₀값은 4.5 µg/mL로 kaempferol(12.0 µg/mL), luteolin(15.6 µg/mL), L-ascorbic acid(9.6 µg/mL)보다 높은 활성을 보이는 것으로 보고한 바 있으며, DDMP는 quercetin에 비해 낮은 항산화 활성을 보일 것으로 판단된다.

Table 1. Antioxidant activity of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP) isolated from heated onion

	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	AEAC (mg AA eq/g) ²⁾
DDMP	241.6±29.2 ^{c3)}	569.0±13.4
Vitamin E	69.2±0.5 ^b	NT ⁴⁾
Ascorbic acid	45.3±4.2 ^a	NT
BHT	268.0±12.8 ^c	NT

¹⁾Concentration of sample to scavenge 50% of the DPPH radicals.

²⁾Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity.

³⁾Means in the same column with the different superscripts are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

⁴⁾NT: not tested.

DDMP는 환원당과 같은 carbonyl 화합물과 아미노산, 펩타이드, 단백질과 같은 amino 화합물간의 Maillard 반응 생성물로 보고되어 있으며(20-22), 최근 Ban 등(23)의 연구에서 DDMP는 대장암 세포인 SW620과 HCT116 cell에서 세포 성장을 효과적으로 억제하고 TNF-α와 TPA 유도된 NF-κB luciferase activity와 NF-κB DNA binding activity를 감소시키는 것으로 보고하였다. 하지만 DDMP에 관한 연구는 아직까지 미비하여 추후 기능성물질로 활용하기 위하여 다양한 생리활성 평가가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

열처리한 양파 착즙액의 ethyl acetate 분획물로부터 항산화 물질을 분리·동정하기 위하여 1, 2차 silica gel column chromatography, preparative TLC 및 HPLC를 이용하여 항산화활성 물질을 분리·정제하였다. GC/MSD, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum 결과로부터 구조 동정한 결과 분리된 물질은 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one(DDMP)으로 확인되었다. DDMP의 항산화활성의 IC₅₀값은 241.6 µg/mL이었으며, vitamin E의 69.2 µg/mL와 C의 45.3 µg/mL보다는 낮은 활성을 보였고 BHT의 268.0 µg/mL보다는 높은 활성을 보였지만 유의적인(p>0.05) 차이는 나타나지 않았다. 추후 DDMP를 기능성물질로 활용하기 위하여 다양한 생리활성 평가가 필요할 것으로 생각된다.

문 헌

- Kim JK, Seo Y, Noh SK, Cha YJ. 2010. A concentrated onion extract lowers serum lipid levels in rats fed a high-fat diet. *Korean J Food Preserv* 17: 398-404.
- Kwak HJ, Kwon YJ, Jeong PH, Kwon JH, Kim HK. 2000. Physiological activity and antioxidative effect of methanol extract from onion (*Allium cepa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 349-355.
- Shon MY, Choi SD, Kahng GG, Nam SH, Sung NJ. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem Toxicol* 42: 659-666.
- Kim SJ, Kim GH. 2006. Quantification of quercetin in differ-

- ent parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. *Food Sci Biotechnol* 15: 39-43.
5. Xiao H, Parkin KL. 2007. Isolation and identification of potential cancer chemopreventive agents from methanolic extracts of green onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 68: 1059-1067.
 6. Saleheen D, Ali SA, Yasinzai MM. 2004. Antileishmanial activity of aqueous onion extract *in vitro*. *Fitoterapia* 75: 9-13.
 7. Nho JW, Hwang IG, Joung EM, Kim HY, Chang SJ, Jeong HS. 2009. Biological activities of *Magnolia denudata* Desr. flower extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1478-1484.
 8. Park YO, Lim HS. 2009. Antioxidant activities of bamboo (*Sasa borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1640-1648.
 9. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem* 99: 381-387.
 10. Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. *Korean J Food Sci Technol* 38: 331-336.
 11. Hwang IG, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Yang MH, Jeong HS. 2006. Change of physicochemical characteristics of Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) juice with heat treatment conditions. *Korean J Food Sci Technol* 38: 342-347.
 12. Woo KS, Jang KI, Kim KY, Lee HB, Jeong HS. 2006. Antioxidative activity of heat treated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts. *Korean J Food Sci Technol* 38: 355-360.
 13. Lee SH, Hwang IG, Lee YR, Joung EM, Jeong HS, Lee HB. 2009. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of heated radish (*Raphanus sativus* L.) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 490-495.
 14. Kim HY, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Jeong HS. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol* 40: 166-170.
 15. Woo KS, Hwang IG, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2007. Changes in the antioxidant activity of onion (*Allium cepa*) extracts with heat treatment. *Food Sci Biotechnol* 16: 828-831.
 16. Lee YR, Hwang IG, Woo KS, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2007. Antioxidative activities of the ethyl acetate fraction from heated onion (*Allium cepa*). *Food Sci Biotechnol* 16: 1041-1045.
 17. Hwang IG, Woo KS, Kim DJ, Hong JT, Hwang BY, Lee YR, Jeong HS. 2007. Isolation and identification of an antioxidant substance from heated garlic (*Allium sativum* L.). *Food Sci Biotechnol* 16: 963-966.
 18. Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A* 1112: 3-22.
 19. Moon HI, Ahn KT, Lee KR, Zee OP. 2000. Flavonoid compounds and biological activities on aerial parts of *Angelica gigas*. *Yakhak Hoeji* 44: 119-127.
 20. Kim MO, Baltus W. 1996. On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard reaction. *J Agric Food Chem* 44: 282-289.
 21. Wagner KH, Herr SDM, Elmadfa WSI. 2002. Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. *Food Chem* 78: 375-382.
 22. Lee YG. 2006. Study of reaction products and color changes in glutamine-glucose model system during heating. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 881-885.
 23. Ban JO, Hwang IG, Kim TM, Hwang BY, Lee US, Jeong HS, Yoon YW, Kim DJ, Hong JT. 2007. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF- κ B in human colon cancer cells. *Arch Pharm Res* 30: 1455-1463.

(2011년 1월 24일 접수; 2011년 2월 27일 채택)